



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 16 098 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 197 16 098.0
㉑ Anmeldetag: 17. 4. 97
㉒ Offenlegungstag: 22. 10. 98

㉓ Int. Cl.⁶:
A 61 K 38/36
A 61 K 38/19
A 61 K 38/37
A 61 K 38/38
A 61 K 38/18
// (A 61 K 38/36, 38:19,
38:37, 38:38)

DE 197 16 098 A 1

㉔ Anmelder:
Klinikum der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg,
79106 Freiburg, DE

㉕ Vertreter:
Lederer, Keller & Riederer, 80538 München

㉖ Erfinder:
Mertelsmann, Roland, Prof., 79104 Freiburg, DE;
Rosenthal, Felicia, Dr., 79102 Freiburg, DE;
Kulmburg, Peter, Dr., 79106 Freiburg, DE; Stark,
Björn, G., Prof. Dr., 79199 Kirchzarten, DE; Tanczos,
Eszter, Dr., 79104 Freiburg, DE; Kopp, Jürgen, 79102
Freiburg, DE

㉗ Entgegenhaltungen:
DE 44 06 073 A1
US 53 02 701
US 51 96 196
WO 95 07 105 A1
WO 92 15 676 A1
WO 90 08 771 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ㉘ Fibroblasten mit einem Fremdgen enthaltende Zusammensetzung zur Behandlung von Wunden
㉙ Die vorliegende Erfindung offenbart eine Zusammensetzung zur Behandlung von Wunden, die Fibroblasten, die wenigstens ein Fremdgen kodierend für ein die Wundheilung förderndes Zytokin enthalten und wenigstens eine weitere die Wundheilung fördernde Komponente umfaßt.

: 197 16 098 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Zusammensetzung zur Behandlung von Schädigungen der Haut, die nur schwer behandelbar sind. Bei großflächigen Verbrennungen kann es ein erhebliches Problem darstellen, die durch die Schädigung zerstörten Hautbereiche wiederherzustellen, insbesondere wenn ganz überwiegende Teile der Haut schwer geschädigt sind. Auch bei anderen Erkrankungen wie beispielsweise Tumorerkrankungen oder chronischen Hautschädigungen stellt es häufig ein ganz erhebliches Problem dar, die geschädigten Hautbereiche wiederherzustellen.

Aus dem Stand der Technik ist die Verwendung von kultivierten autologen Keratinozyten, die in Fibrinkleber suspendiert sind, zur Behandlung von großflächigen Verbrennungswunden bekannt [Stark et al., Eur. J. Plast. Surg. (1995) 18, S. 267-271]. Es wurde auch bereits im Schweinemodell versucht, bei der Wundheilung Keratinozyten einzusetzen, die in situ mit Hilfe von Partikel-DNA-Transfer transfiziert wurden [Andree et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1994) 91, S. 12188-12192].

Andreatta-van Leyen et al. [J. Biomedical Materials Res., Vol. 27 (1993), S. 1201-1208] beschreiben eine Wundbehandlung, die gentransfizierte Keratinozyten umfaßt, die Rinderwachstumshormon (bGH) produzieren.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Lösungsvorschläge greifen zum Teil auf Keratinozytenpräparationen (z. B. sog. Keratinozyten-Sheets) zurück, die sehr schwierig zu handhaben sind und oft erst dann verwendet werden können, wenn sich bei der Zellkultivierung räumliche Strukturen gebildet haben. Die Verwendung von allogenen Keratinozyten führt aufgrund von immunologischen Reaktionen zu deren Elimination. Darüber hinaus besteht die Gefahr, daß allogene Präparate, insbesondere solche, die von verschiedenen Spendern stammen und nicht charakterisiert sind, mit Viren (HIV, HCV oder noch nicht charakterisierte Viren) kontaminiert sind und, daß dadurch der zu behandelnde Patient infiziert werden kann.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Zusammensetzungen zur Behandlung von Wunden enthaltend Fibroblasten, die wenigstens ein Fremdgen kodierend für ein die Wundheilung förderndes Zytokin enthalten und wenigstens eine weitere die Wundheilung fördernde Komponente. Darüber hinaus kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung weitere Bestandteile aufweisen, die üblicherweise in derartigen Zusammensetzungen verwendet werden.

Bei der weiteren die Wundheilung fördernden Komponente kann es sich um einen sogenannten Fibrinkleber handeln. Derartige Fibrinkleber sind kommerziell erhältlich und werden in verschiedenen Bereichen der Medizin, insbesondere in der Chirurgie eingesetzt.

Bei der Fibrinklebung wird im Prinzip die letzte Phase der Blutgerinnung benutzt. Der Fibrinkleber beinhaltet Fibrinogen, das vom Thrombin zum monomeren Fibrin umgesetzt wird. Dieses wiederum bildet durch End-zu-End- bzw. Seit-zu-Seit-Anlagerung aggregiertes Fibrin. Außerdem beinhaltet der Fibrinkleber in bevorzugter Ausführungsform Fibronectin. Gleichzeitig aktiviert Thrombin den Faktor XIII, der üblicherweise bei dem Fibrinkleber in ausreichender Menge vorhanden ist. Der Fibrinkleber beinhaltet als weitere Komponente eine Thrombinlösung, die häufig zusammen mit Kalziumchlorid als separate Komponente zugefügt wird.

Darüber hinaus kann der Fibrinkleber auch ausreichende Mengen an Albumin oder Plasminogen enthalten.

Bei der weiteren die Wundheilung fördernden Komponente kann es sich auch um einen festen Bestandteil handeln, der als Trägermatrix dient. Derartige Träger für "künstliche Haut" sind kommerziell erhältlich (beispielsweise Laserskin® oder Biobrane®). Bei den festen Komponenten kann es sich um eine Matrix aus einem Derivat der Hyaluronsäure handeln, vorzugsweise um einen Hyaluronsäureester. Bei der Hyaluronsäure handelt es sich um einen körpereigenen Bestandteil im Bindegewebe, der einer außerordentlich hohen Umsatzrate unterliegt. Wenn also die Matrix aus Hyaluronsäure besteht, wird sie in der Wunde sehr rasch von der körpereigenen Hyaluronidase abgebaut. Daher werden erfindungsgemäß bevorzugt solche Derivate der Hyaluronsäure eingesetzt, die etwas langsamer im Körper abgebaut werden.

Ein besonderer Vorteil, der durch die Verwendung einer Trägermatrix erzielt werden kann, ist, daß Zellen auf die Wunde aufgebracht werden können, die noch keinen zusammengewachsenen Zellverband bilden. Wenn bei der erfindungsgemäßen Zusammensetzung auch Keratinozyten eingesetzt werden, können diese mit Hilfe der Trägermatrix im subkonfluenten Zustand verwendet werden. Zu diesem Zeitpunkt befinden sie sich in ihrer optimalen Wachstumsphase, teilen sich noch sehr häufig und reagieren besonders gut auf die Zytokine, die von den gentransfizierten Fibroblasten produziert werden. Sie sind somit früher verfügbar als klassische konfluente Transplantate.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann in einer bevorzugten Ausführungsform auch Keratinozyten, und zwar bevorzugt autologe Keratinozyten umfassen. Die Keratinozyten bilden insbesondere die äußere Hautschicht, die sogenannte Epidermis. Keratinozytenkulturen können nach einer an sich bekannten Routinetechnik kultiviert werden [z. B. Rheinwald et al. Nature 265 (1977) S. 421-424]. Hierbei wird üblicherweise ein kleines Stück der Haut mittels Biopsie entfernt und dann werden Epidermis und Dermis voneinander getrennt. Aus der Epidermis wird eine Zellsuspension hergestellt, vorzugsweise durch Behandlung mit einem proteolytischen Enzym. Die so erhaltenen einzelnen Zellen werden dann in Kulturbedältern (Flaschen oder Schalen) unter sterilen Bedingungen angezogen und zu einem geeigneten Zeitpunkt von den Kultivierungsbehältern abgelöst.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung weist genetisch veränderte Fibroblasten auf. Fibroblasten sind dem Mesenchym entstammende Zellen mit einem großen Zelleib und einem etwas abgeplatteten Kern. Die Fibroblasten sind insbesondere an der Bildung der Interzellularsubstanz des Bindegewebes beteiligt. Erfindungsgemäß können entweder autologe Fibroblasten eingesetzt werden oder in einer bevorzugten Form werden allogene Fibroblasten verwendet, die von einem anderen Individuum, also nicht dem zu behandelnden Patienten stammen. Ganz besonders bevorzugt werden solche Fibroblasten eingesetzt, die klonal selektiert wurden, d. h. von einem Klon abstammen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die gentransfizierten Fibroblasten mit einer derartigen Dosis ionisierender Strahlen behandelt worden, daß die Fibroblasten nach einer gewissen Zeit absterben und sich nicht mehr vermehren können. Diese Bestrahlung hat den Vorteil, daß die gentransfizierten Zellen mit Sicherheit im Körper absterben, und zwar nach einer überschaubaren Zeit (< 3 Wochen). In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden erfindungsgemäß Zellen von immortalisierten Fibroblastenzelllinien verwendet, wobei sich eine Zelllinie, die die Bezeichnung KMST-6 erhalten hat, besonders bewährt hat. Immortalisierte Fibroblastenzelllinien sind vorteilhaft, da sie kontinuierlich

kultiviert und biologisch genau charakterisiert verwendet werden können. Ohne Schwierigkeiten können daher auch andere geeignete immortalisierte Fibroblastenzelllinien verwendet werden.

In die erfindungsgemäß eingesetzten Fibroblasten wird ein Fremdgen, das für ein geeignetes Zytokin kodiert, eingebracht. Bevorzugt handelt es sich bei diesem Fremdgen um ein Gen, das für ein Zytokin wie EGF, TGF- α oder KGF kodiert.

Der epidermale Wachstumsfaktor (epidermal growth factor) wird kurz als EGF bezeichnet. Es handelt sich hierbei um ein globuläres Protein von etwa 6,4 kDa, das 53 Aminosäuren aufweist. Erfindungsgemäß ist es nicht unbedingt erforderlich, daß das vollständige Gen in die transfizierten Fibroblasten eingebracht wird; es ist ausreichend, wenn derjenige Teil eingeführt wird, der die biologische Aktivität aufweist. Um eine Sekretion des biologisch aktiven Peptids zu ermöglichen, ist der entsprechende cDNA-Anteil bevorzugt in Leserahmen mit der sekretorischen Signalsequenz des humanen G-CSF fusioniert. Erfindungsgemäß werden bevorzugt auch EGF-ähnliche Proteine, wie beispielsweise der transformierende Wachstumsfaktor α (transforming growth factor) TGF- α , der eine hohe Homologie zu EGF aufweist, eingesetzt. Die biologische Aktivität von EGF und TGF- α ist vergleichbar. Beide Zytokine haben einen Einfluß auf die epidermale Entwicklung und die Differenzierung der Zellen.

Ein weiteres bevorzugt eingesetztes Zytokin ist der Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF), der insbesondere die Teilung von teilungsfähigen Keratinozyten stimuliert. Erfindungsgemäß können auch Varianten der Gene eingesetzt werden. Derartige Varianten können Deletionen oder Anfügungen aufweisen und die Sequenz kann gezielt verändert sein.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Fibroblasten enthalten ein Fremdgen, das für ein die Wundheilung förderndes Zytokin kodiert. Dieses Fremdgen kann bevorzugt vom Menschen, aber auch von einem Tier, wie beispielsweise Maus oder Rind stammen. Voraussetzung ist aber, daß das Zytokin dann nicht Speziespezifisch ist, wenn das Fremdgen von einer anderen Spezies her stammt.

Es ist erforderlich, daß das Fremdgen in die Fibroblasten eingebracht wird. Dies kann dadurch bewirkt werden, daß das gewünschte Gen in einen geeigneten Vektor eingebaut wird und dann in die Fibroblasten transfiziert wird. Als Vektoren eignen sich virale Vektoren oder Plasmidvektoren, wobei die Plasmidvektoren besonders bevorzugt sind, da bei viralen Vektoren zusätzliche Untersuchungen zum Ausschluß von Kontamination mit replikationskompetenten Viren durchgeführt werden müssen.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen weisen verschiedene Vorteile auf gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Lösungen.

Durch die genveränderten Fibroblasten wird das Zytokin von den lebenden Zellen in das Gewebe abgegeben. Insbesondere wenn autologe Keratinozyten verwendet werden, kann die Histoinkompatibilitätsabstoßungsreaktion vermieden werden. In Kombination mit lethal bestrahlten gentransfizierten Fibroblasten kann für eine vorbestimmte Zeit das oder die gewünschten Zytokine exprimiert werden. Aufgrund der kontinuierlichen Produktion des Zytokins können die Probleme umgangen werden, die auf die kurze Halbwertszeit von Zytokinen bei lokaler externer Applikation zurückzuführen sind. Bei den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können verschiedene Zelltypen (Keratinozyten/Fibroblasten) miteinander kombiniert werden, wobei die gentransfizierten Fibroblasten auch unterschiedliche Zytokine beinhalten können. Dadurch können gezielt verschiedene Wachstumsfaktoren in den Wundbereich eingebracht werden. Es ist auch denkbar, zusätzlich Gene für Wachstumsfaktoren einzuführen, die auf weiße Blutkörperchen wirken, wie beispielsweise G-CSF oder GM-CSF, um dadurch die körpereigene Immunabwehr in den Wundbereichen zu stimulieren. Dadurch kann die körpereigene Abwehr gegenüber Infektionen gestärkt werden, was insbesondere bei Verbrennungswunden relevant ist.

Es ist auch durchaus möglich, die erfindungsgemäße Zusammensetzung ohne Keratinozyten einzusetzen. In diesem Fall wird durch die genveränderten Fibroblasten das Zytokin in die Umgebung abgegeben und es werden diejenigen Keratinozyten des behandelten Patienten stimuliert, die sich beispielsweise in den Randbereichen der Wunde finden.

Beschreibung der Figuren

Fig. 1 zeigt die Struktur des Expressionsvektors für humanes EGF. Teil (A) zeigt die Plasmidkonstruktion mit dem chimären EGF-Gen. Teil (B) zeigt die Sequenz der Fusion im Leserahmen zwischen der humanen G-CSF-Signalsequenz (unterstrichen) und der reifen für humanes EGF kodierenden Region (Asn Ser Asp ...).

Fig. 2 zeigt die Sekretion von EGF von Fibroblasten, die mit dem Plasmid pCMV-EGF-IRES-TKNeo transfiziert wurden. Es handelt sich hierbei um Fibroblasten der Zelllinie KMST-6 nach Bestrahlung (100 Gy). Bei dem Versuch wurden 2×10^5 bestrahlte Zellen in Kulturplatten mit sechs Löchern ausgesät und die EGF-Konzentration wurde in Kulturüberständen nach 24 Stunden bestimmt. Die Werte stellen Durchschnittswerte dar.

Fig. 3 zeigt die Bioaktivität von chimären EGF-Polypeptiden, die von den Klonen #3 und #6 von gentransfizierten KMST-6-Fibroblasten erhalten wurden.

Teil (A) zeigt die Bioaktivität an Mäusekeratinozyten vom Stamm BALB/MK.

Teil (B) zeigt die Ergebnisse, die mit Hilfe von menschlichen primären Keratinozyten erhalten wurden. Die Werte geben die Durchschnittsergebnisse von acht Messungen mit Standardabweichung an. Die gepunkteten Balken stellen die Eichkurve dar, die mit rekombinantem EGF erhalten wurden. Die leeren Balken stellen die Kontrollwerte dar, erhalten mit Fibroblasten der Zelllinie KMST-6. Die gestreiften und grauen Balken stellen die Ergebnisse dar, die mit Kulturüberständen beider Klone 3 bzw. 6 erhalten wurden.

Fig. 4 zeigt die Proliferation von primären menschlichen Keratinozyten im Kulturtest mit bestrahlten Fibroblasten der Zelllinie KMST-6, die gentransfiziert wurden.

Teil (A) zeigt die Ergebnisse nach vier Tagen Co-Kultur.

Teil (B) zeigt die Ergebnisse nach 10 Tagen Co-Kultur.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgend aufgeführten Beispiele weiter erläutert:

Beispiel 1

Konstruktion eines Plasmids enthaltend ein Gen für EGF und Transfektion

In den meisten menschlichen Zellen wird EGF als ein 130 kDa Transmembranglycoprotein-Precursormolekül synthetisiert, das proteolytisch gespalten wird in das biologisch aktive 6,2 kDa EGF-Peptid mit 53 Aminosäuren. Erfindungsgemäß wurde daher ein chimäres Konstrukt hergestellt, das für eine In-Leserahmen-Fusion des reifen EGF-Peptids und die menschliche G-CSF sekretorische Signalsequenz kodiert. Der Aufbau ist schematisch in Fig. 1(A) dargestellt. Das dabei entstandene DNA-Fusionstragament wurde unter die transkriptionelle Kontrolle des menschlichen CMV (Cytomegalievirus)-Promotors gestellt und in einen dicystronischen Vektor eingebaut, um die Expression des Transgens an die Selektion des Markers Neomycin-Phosphor-Transferase zu binden.

Bei der Klonierung wurde die für das reife menschliche EGF-Peptid kodierende Sequenz mit Hilfe der PCR-Technologie amplifiziert und das dabei erhaltene Produkt in dem Vektor pBluescript (Stratagene) subkloniert und anschließend sequenziert. Ebenso wurde die menschliche G-CSF-Signalsequenz aus menschlicher G-CSF cDNA mit Hilfe der PCR-Technologie amplifiziert, wobei eine verbesserte Kozak-Konsensus-Sequenz am 5'-Ende und eine einzelne NheI Restriktionsschnittstelle geschaffen wurden. Die relevante Sequenz ist in Fig. 1(B) dargestellt.

Das so erzeugte Plasmid wurde in menschliche Fibroblasten der Zelllinie KMST-6 transfiziert und alle Neomycin-resistenten Klone sekretierten menschliches EGF, was durch einen ELISA-Test nachgewiesen wurde. Die Kontrolle zeigte, daß nicht transfizierte menschliche Fibroblasten der Zelllinie KMST-6 keine nachweisbare Mengen an hEGF sowohl vor als auch nach Bestrahlung sekretierten.

Für die weiteren Untersuchungen wurden die Klone #3 und #6 verwendet, die 37 bzw. 8 ng EGF/10⁶ Zellen und 24 Stunden sekretierten.

Die Sekretion von menschlichem EGF in den Überstand durch transfizierte Fibroblasten wurde mit Hilfe der ELISA-Technik (Quantikine, R & D Systems) bestimmt. Es wurde der Überstand von bestrahlten oder nicht bestrahlten Ausgangszellen oder EGF-gentransfizierten Zellen nach 24 Stunden entnommen und hinsichtlich der EGF-Produktion untersucht, nachdem die Anzahl der lebensfähigen Zellen bestimmt wurde.

Eine Bestrahlung wurde bei Raumtemperatur mit einer ¹³⁷Cs-Bestrahlungsquelle mit einer Dosisrate von 3 Gy/Minute durchgeführt.

Beispiel 2

Einfluß einer lethalen Bestrahlung auf die Expression von chimärem EGF-Protein durch gentransfizierte Fibroblasten

Für optimale Wundheilungsergebnisse ist es erforderlich, daß EGF in den ersten Tagen der Behandlung zur Verfügung steht. Andererseits kann durch eine lethale Bestrahlung das unkontrollierte in vivo-Wachstum von genetisch modifizierten Zellen verhindert werden. Es wurde daher der Einfluß einer lethalen Bestrahlung auf die Expression von EGF untersucht, wobei KMST-6 Fibroblasten (Klon #3, transfiziert mit dem Plasmid pCMV-EGF-IRES-TKNeo) untersucht wurden. Es wurde gefunden, daß nach Bestrahlung mit 100 Gy die Sekretion von EGF langsam absank, aber im Überstand über mindestens sieben Tage in vitro nachweisbar war. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 zusammengefaßt.

Beispiel 3

Biologische Aktivität des chimären EGF-Polypeptids

Um nachzuweisen, daß das EGF-Prtein, das von den transfizierten Fibroblasten sekretiert wird, auch tatsächlich die biologische Aktivität aufweist, wurden die Überstände der Medien von den EGF-gentransfizierten Klonen auf die mitogene Aktivität überprüft an permanenten Mäusekeratinozyten-Zelllinien und an primären humanen Keratinozyten. Zur Kontrolle wurden verschiedene Konzentration von rekombinantem humanem EGF eingesetzt. Beide Zelltypen wurden sowohl durch das rekombinante Protein als auch durch die Kulturüberstände der Klone #3 und #6 in dosisabhängiger Weise stimuliert. Eine optimale Stimulation der Mäusekeratinozyten wurde bei einer Konzentration zwischen 2 und 20 ng rekombinantes hEGF beobachtet. Dies entspricht der Stimulation, erreichbar durch eine 1 : 5 Verdünnung des Kulturüberstandes. Die Ergebnisse sind in Fig. 3(A) dargestellt.

Bei Verwendung von primären humanen Keratinozyten war die effektive Dosis geringfügig niedriger und es wurde eine optimale Proliferation bereits bei 0,2 ng/ml an rEGF und bei einer 1 : 50 Verdünnung des Kulturüberstandes beobachtet. Die Ergebnisse sind in Fig. 3(B) dargestellt. Bei beiden Tests konnte die Tendenz beobachtet werden, daß das Zellwachstum bei höheren Konzentrationen inhibiert wurde. Kulturüberstände von nicht transfizierten Fibroblasten der Zelllinie KMST-6 zeigten keine Stimulierung der Proliferation im Vergleich mit Zellkulturüberständen ohne zugesetzten Wachstumsfaktor. Um die therapeutische Wirksamkeit bei der Wundheilung genauer zu untersuchen, wurden lethal bestrahlte EGF-gentransfizierte Fibroblasten in vitro co-kultiviert mit primären humanen Keratinozyten. Bei den Versuchen zeigte sich, daß nach einer Inkubationszeit von vier Tagen mit verschiedenen Konzentrationen von bestrahlten EGF sekretierenden Fibroblasten eine dosisabhängige Stimulation der Keratinozytenproliferation ähnlich derjenigen erhalten werden konnte, die durch rekombinanten Wachstumsfaktor induziert wurde. Dies ist in Fig. 4 dargestellt, wobei Fig. 4(A) die Werte zeigt nach vier Tagen Co-Kultivierung und die Fig. 4(B) zeigt die Werte nach 10 Tagen Co-Kultivierung.

Beispiel 4

Nachweis der in vivo EGF-Produktion durch in vitro liposomal transfizierte KMST-6 Zellen

Versuchsaufbau

1,5x1,5 cm große Vollhautwunden wurden auf die Rücken von 42 Nacktmäusen gesetzt. $9,4 \times 10^6$ hEGF-transfizierte und letal bestrahlte KMST-6 Zellen wurden in 2,8 ml Fibrinkleber suspendiert und auf den Vollhautwunden von 14 Nacktmäusen transplantiert (300 000 Zellen/cm², Gruppe I).

Als Kontrollen dienten 14 Vollhautwunden, transplantiert mit untransfizierten KMST-6 Zellen (300 000 Zellen/cm², Gruppe II) sowie 14 unbehandelte Vollhautwunden (Gruppe III).

Am Tag 1, 2, 3, 4, 5, 7 und 14 wurden aus jeder Gruppe jeweils zwei Tiere nekropsiert und 0,8 g Wundgewebe mit einem Triton-X-PBS Puffer homogenisiert. Die Homogenisate wurden zentrifugiert und die EGF-Konzentration der Überstände mit Hilfe eines antihuman-EGF ELISA ausgewertet.

Ergebnisse

In vivo waren in der Gruppe I (erfindungsgemäß) am Tag 1 470 pg/ml detektierbar, verglichen mit 18 pg/ml in Gruppe II und 1,3 pg/ml in Gruppe III. An den Tagen 2-7 sanken die EGF-Konzentrationen in der Gruppe I, waren jedoch signifikant höher als in den Kontrollgruppen. Am Tag 14 war kein EGF in allen drei Gruppen detektierbar.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß in vitro EGF-transfizierte Fibroblasten in einer Fibrinkleber-Suspension erfolgreich transplantiert werden konnten. Das transgene Protein war zumindest bis Tag 7 in vivo nachweisbar.

Die bei dem Versuch erhaltenen Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle I zusammengefaßt.

Tabelle I

Tage	pCMV-EGF-IRES-TKNeo/KMST6#3 erfindungsgemäß	KMST6 Kontrolle (transplantiert mit untransfizierten KMST6-Zellen, Gruppe II)	unbehandelte Vollhaut- wunden (Gruppe III)
1	470	18	1,3
2	393	58	1,6
3	330	28	2,3
4	150	8	6,5
5	180	8,5	8
7	140	8,3	2,6
14	0,4	0	0

Tabelle I zeigt die hEGF-Freisetzung in pg/ml in vivo in Wunden durch bestrahlte KMST6-Fibroblasten, die mit chimerem hEGF-Gen transfiziert wurden.

Beispiel 5

Wundheilungsfördernder Effekt nach Transplantation von in vitro EGF-transfizierten KMST-6 Zellen in Kombination mit humanen Keratinozyten (Mischzelltransplantation)

Versuchsaufbau

1,5x1,5 cm große Vollhautwunden wurden auf die Rücken von 72 Nacktmäusen gesetzt. $1,0125 \times 10^6$ EGF-transfizierte und letal bestrahlte KMST-6 Zellen wurden in Kombination mit $2,025 \times 10^6$ humanen Keratinozyten in 3,6 ml Fibrinkleber suspendiert und auf Vollhautwunden von 18 Nacktmäusen transplantiert (Verhältnis 1 : 2, 75 000 Zellen/cm², Gruppe I).

Als Kontrollen dienten 18 Vollhautwunden, transplantiert mit transfizierten KMST-6 Zellen alleine (25 000 Zellen/cm², Gruppe II), 18 Vollhautwunden transplantiert mit humanen Keratinozyten alleine (50 000 Zellen/cm², Gruppe III) sowie 18 Vollhautwunden transplantiert mit nicht-transfizierten KMST-6 Zellen in Kombination mit humanen Keratinozyten (Verhältnis 1 : 2, 75 000 Zellen/cm², Gruppe IV).

Am Tag 1, 3, 5, 7, 10, 12 und 14 wurde aus jeder Gruppe jeweils ein Tier nekropsiert und 0,8 g Wundgewebe mit ei-

nem Triton-X-PBS Puffer homogenisiert. Die Homogenisate wurden zentrifugiert und die EGF-Konzentration der Überstände mit Hilfe eines anti-human-EGF ELISA ausgewertet.

An den post-OP-Tagen 5, 7, 10, 12, 14, 17 und 21 wurden von jeweils zwei Tieren aus jeder Gruppe Biopsien histologisch untersucht.

5

Ergebnisse

Wie erwartet war in Gruppe I und II EGF detektierbar, jedoch nicht in Gruppe III und IV.

Die Ergebnisse zeigen sowohl bezüglich des Wundverschlusses (in Gruppe 1 bereits nach Tag 7 komplette Epithelisierung, während die Kontrollwunden noch nach 3 Wochen offen sind) als auch bezüglich der Rekonstitutionsqualität der Epidermis (Zellagigkeit des Epithels) die besten Ergebnisse in der Gruppe der Tiere, welche mit einer Kombination EGF-transfizierter Fibroblasten und Keratinozyten behandelt wurden. Interessanterweise führt aber auch schon die alleinige Aufbringung transfizierter Fibroblasten (Gruppe II), möglicherweise durch Stimulation randständiger Mäusekeratinozyten, zu einer Beschleunigung der Epithelisierung im Vergleich zu den anderen Kontrollgruppen.

Diese Resultate belegen den wundheilungsfördernden Effekt der erfindungsgemäß eingesetzten EGF-transfizierten Fibroblasten.

Beispiel 6

Wundheilungsfördernder Effekt nach Transplantation von in vitro EGF-transfizierten KMST-6 Zellen im Großtiermodell

Versuchsaufbau

In einem Großtierversuch an Schweinen wurden auf 21 standardisierten (5 cm² groß, Grad2a) Verbrennungswunden EGF-transfizierte KMST-6 Zellen in Fibrinkleber transplantiert (300 000 Zellen/cm²). Als Kontrolle dienten 21 unbehandelte standardisierte Verbrennungswunden, 14 standardisierte, mit nichttransfizierten Fibroblasten transplantierte Verbrennungswunden sowie 7 standardisierte Verbrennungswunden, die mit Fibrinkleber behandelt wurden.

Am Tag 1, 3, 5, 7, 10, 21 und 35 wurde aus jeder Gruppe jeweils eine Wunde biopsiert und 0,8 g Wundgewebe mit einem Triton-X-PBS Puffer homogenisiert. Die Homogenisate wurden zentrifugiert und die EGF-Konzentration der Überstände mit Hilfe eines anti-human-EGF ELISA ausgewertet. Weiterhin wurden die Biopsien histologisch ausgewertet.

30

Ergebnisse

In den Wundhomogenisaten, die zuvor mit EGF-transfizierten Fibroblasten transplantiert worden waren, lassen sich höhere EGF-Konzentrationen nachweisen als in den Homogenisaten der Kontrollwunden. Diese Ergebnisse sind mit denen im Nacktmausmodell vergleichbar.

Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch ist eine verbesserte Wundheilung in den Wunden, die zuvor mit EGF-transfizierten KMST-6 Zellen transplantiert worden waren, deutlich erkennbar.

40

Patentansprüche

1. Zusammensetzung zur Behandlung von Wunden, die Fibroblasten, die wenigstens ein Fremdgen kodierend für ein die Wundheilung förderndes Zytokin enthalten und wenigstens eine weitere die Wundheilung fördernde Komponente umfaßt.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die die Wundheilung fördernde Komponente ein Fibrinkleber ist.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Fibrinkleber Fibrinogen und Fibronectin sowie gegebenenfalls Albumin, Faktor XIII und Plasminogen umfaßt.
4. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die weitere die Wundheilung fördernde Komponente eine feste Komponente ist, die als Trägermatrix dient.
5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die feste Komponente eine aus einem Hyaluronsäureester bestehende Trägermatrix ist.
6. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie auch Keratinozyten umfaßt.
7. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das für das Zytokin kodierende Gen ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend das Gen kodierend für den transformierenden Wachstumsfaktor α (TGF- α), das Gen kodierend für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), das Gen kodierend für den basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (b-FGF) und das Gen kodierend für den Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF).
8. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Fibroblasten wenigstens ein weiteres Fremdgen, kodierend für ein Zytokin, das auf Blutzellen wirkt, umfaßt.
9. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das für das Zytokin kodierende Gen mit Hilfe eines Plasmidvektors in die Fibroblasten eingebracht wurde.
10. Zusammensetzung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Plasmidvektor eine In-Leserahmenfusion des Gens kodierend für das reife Zytokin und eine sekretorische Signalsequenz aufweist.
11. Zusammensetzung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der sekretorischen Signalsequenz um die des menschlichen G-CSF Gens handelt.
12. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um auto-

loge Fibroblasten handelt.

13. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um allogene Fibroblasten handelt.

14. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Fibroblasten bestrahlt wurden.

15. Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um klonal-selektierte Fibroblasten handelt.

16. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den allogenen Fibroblasten um Fibroblasten der Zelllinie KMS'T-6 handelt.

17. Verwendung von Fibroblasten, die wenigstens ein Fremdgen, kodierend für ein die Wundheilung förderndes Zytokin enthalten, für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Wunden.

18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Fremdgen ausgewählt ist unter den Genen kodierend für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den transformierenden Wachstumsfaktor α (TGF- α) und den Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF).

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

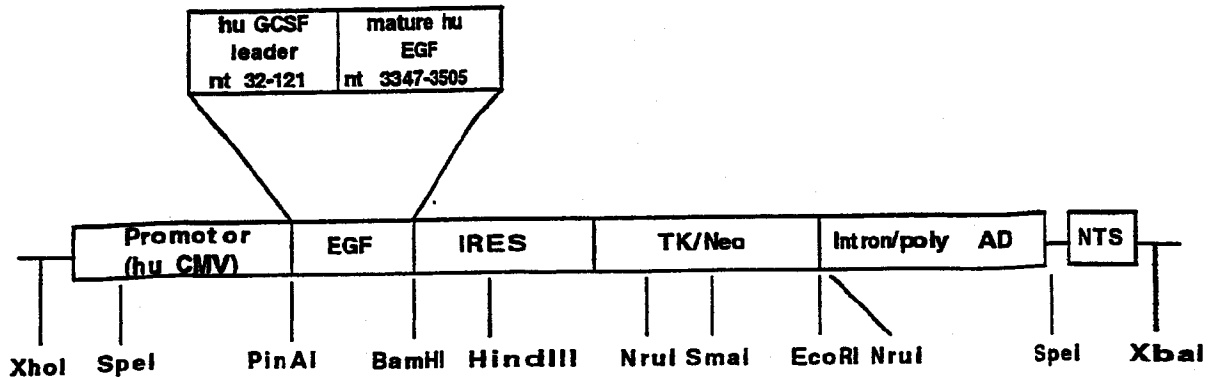
55

60

65

- Leerseite -

A



B

PstAI Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala
ACCGGTGCC ATG GCT GGA CTT GCC ACC CAG AGC CCC ATG AAG CTG ATG GCC

Leu Gln Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala *ser*
CTG CAG CTG CTG CTG TGG CAC AGT GCA CTC TGG ACA GTG CAG GAA GCT agc *NheI*

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His Asp
AAT AGT GAC TCT GAA TGT CCC CTG TCC CAC GAT GGG TAC TGC CTC CAT GAT

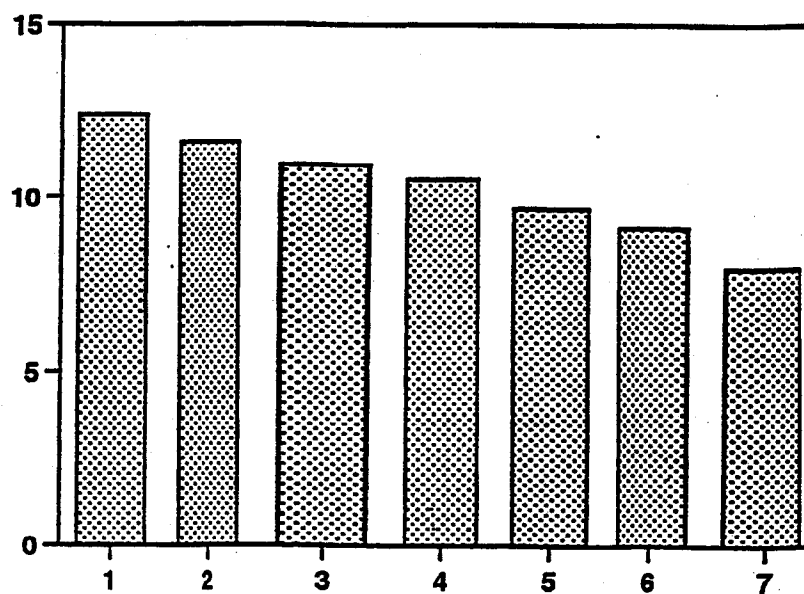
Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn Cys Val
GGT GTG TGC ATG TAT ATT GAA GCA TTG GAC AAG TAT GCA TGC AAC TGT GTT

Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys Trp Trp Glu
GTT GGC TAC ATC GGG GAG CGA TGT CAG TAC CGA GAC CTG AAG TGG TGG GAA

Leu Arg Stop *BamHI*
CTG CGC TGA TGAGGATCC

Fig. 1

EGF
ng/24h



Tage nach Bestrahlung

Fig. 2

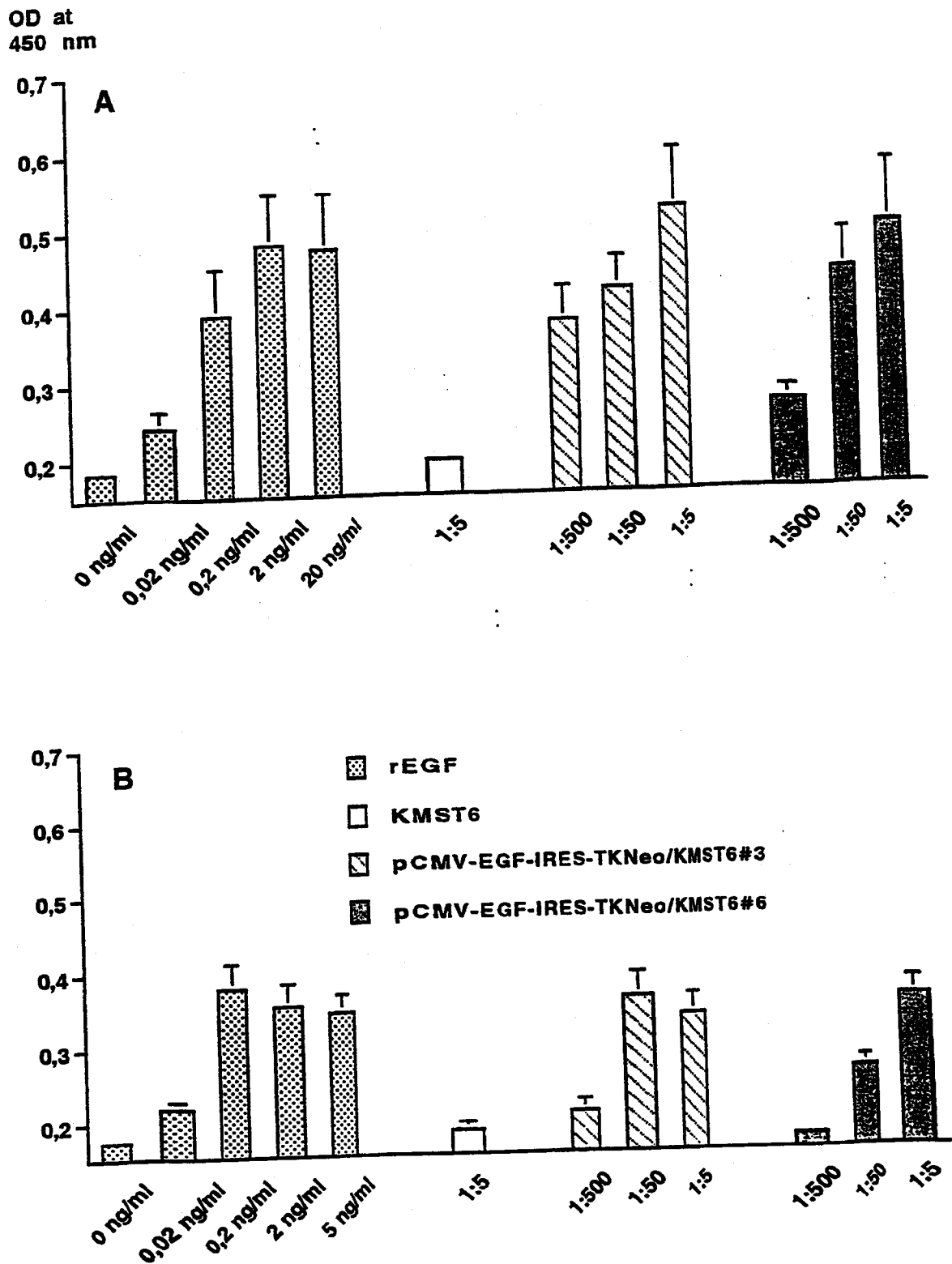


Fig. 3

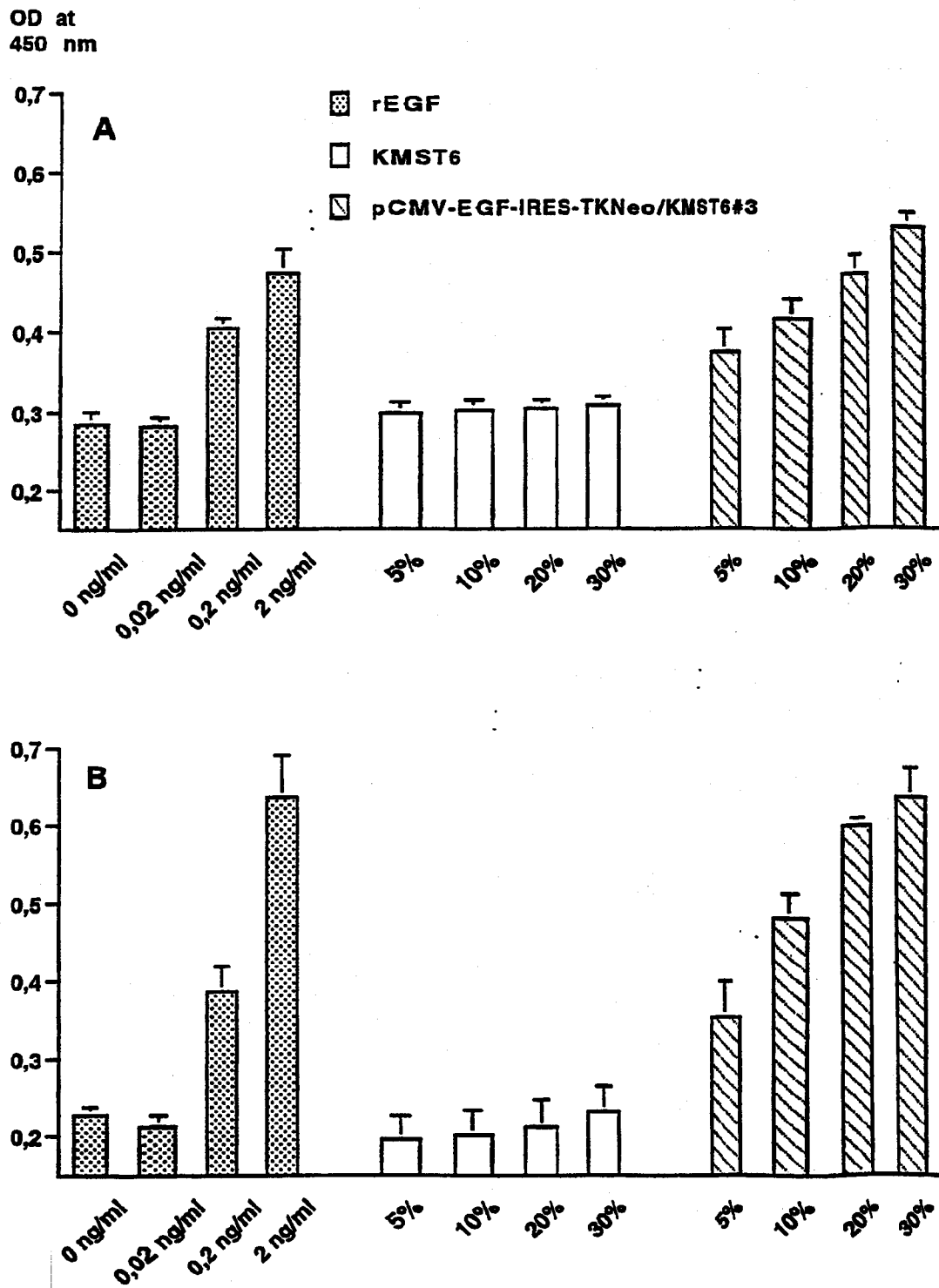


Fig. 4